مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۷، شماره۳، مرداد و شهریور۱۳۹۱(شماره پی در پی ۶۹)

تعیین مشخصات کیست‌های هیداتید جدا شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج به روش PCR-RFLP

عبدالله صدری[۱]، عبدالعلی مشفع[۲*]، عباس دوستی[۳]، حسین انصاری[۱]، حسن عبیدی[۴]، صادق قربانی دالینی[۱]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، [۲]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، [۳]دانشگاه آزاد اسلامی، واحدشهرکرد، گروه بیوتکنولوژی، [۴] دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به وجود ۱۰ ژنوتیپ مختلف از انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس با میزبان‌های واسطه و نهایی مختلف و اثرگذاری این ژنوتیپ‌ها در چرخه زندگی انگل و انتقال آن به انسان، هدف این مطالعه تعیین خصوصیات مولکولی جدایه‌های کیست‌های هیداتید و انتشار آنها در کبد و ریه دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۹۳ کیست هیداتید دامی(۳۱ نمونه گوسفند، ۵۶ نمونه بز و ۶ نمونه گاو) از کشتارگاه صنعتی یاسوج جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی‌از پروتواسکولکس‌های مربوطه با روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید. قطعه‌ی rDNA-ITS1 هر کدام از نمونه ها به روش PCR با پرایمرهای EgR وEgF، تکثیر شد و محصولات PCR ابتدا با الکتروفورز بررسی و سپس با آنزیم های Alu I و Rsa I برش داده شده و محصولات PCR-RFLP قطعات مزبور الکتروفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: با استفاده از روش PCR، اندازه قطعات rDNA-ITS1 تمام جدایه‌های کبدی و ریوی دارای باندهای مشابه و اندازه ۱۰۰۰bp به دست آمد. الگوی ایجاد شده با استفاده از آزمون RFLP با آنزیم های AluI و Rsa I ژنوتیپ G1 یعنی همان ژنوتیپ گوسفندی اکینوکوکوس گرانولوزوس را نشان داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد، سویه G1، سویه غالب ایجاد کنندهٔ بیماری کیست هیداتید در اعضای مختلف دام از جمله کبد و ریه در شهر یاسوج می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، ژنوتیپ، کیست هیداتید، دام

[*]**نویسنده مسئول: دکتر عبدالعلی مشفع**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

Email: amoshfea@yahoo.com

مقدمه

هیداتیدوز ناشی از اکینوکوکوس گرانولوزوس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد و در اکثر مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل دنیا شایع است (۲و۱). اخیراً اکینوکوکوس گرانولوزوس به گروه های ذیل تقسیم شده است؛ اکینوکوکوس گرانولوزوس سنسیو استریکو شامل؛ استرین گوسفندی(G1)، استرین گوسفندی تاسمانیایی (G2)، استرین بوفالویی(G3)، اکینوکوکوس اکوینیس شامل استرین اسبی(G4)، اکینوکوکوس ارتلپی شامل استرین گاوی(G5) و اکینوکوکوس کانادینزیس شامل استرین شتری(G6)، استرین خوکی(G7)، استرین گوزنی(G8)، استرین انسانی(G10) و استرین فنوس کاندین(٤و٣). در میان این ژنوتیپ‌ها گروه اکینوکوکوس گرانولوزوس سنسیو استریکو استرین گوسفندی(G1) در سراسر جهان بیشترین گستردگی را دارد(۱۰ـ۵).

این سویه‌ها از نظرخصوصیات ریخت‌شناسی، همه‌گیری شناسی، درمان و کنترل با هم اختلاف دارند. به‌طوری که این سویه‌ها ویژگی‌های آسیب‌شناسی، اختصاصیت میزبانی، بیولوژی تکامل، فیزیولوژی، ژنتیک، بیماری‌زایی انگل برای میزبان، الگوی چرخه زندگی انگل، پاتوژنیسیتی، آنتی‌ژنیسیتی، روند انتقال آلودگی و حساسیت آنها نسبت به عوامل دارویی را در مواردی می‌توانند تحت تأثیر قرار دهند. تمامی‌موارد فوق بر طراحی و ساخت واکسن‌ها، تشخیص، پاسخ درمانی، همه‌گیری‌شناسی و کنترل تأثیر می‌گذارند(۱۳ـ۱۰ و۵).

وضعیت آلودگی دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج به کیست هیداتید طی سال‌های ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ با مطالعه آمار ثبت شده در کشتارگاه بررسی گردید که از ۱۹۰۸۶۱ دام ذبح شده در سال‌های مورد نظر ۱۱۰۳۳ دام اعم از گوسفند، گاو و بز به کیست هیداتید کبد و ریه مبتلا بودند که بیشترین آلودگی مربوط به کیست هیداتید ریه گوسفندان(۴/۶۶درصد) بود(۱۴).

نتایج نشان داد که کیست هیداتید بیماری بومی‌شهر یاسوج بوده و طی سال‌های گذشته در روند ایجاد بیماری و تعداد موارد آن تغییر خاصی صورت نگرفته است. از طرفی تعداد موارد بروز سالانه این بیماری در این منطقه نسبت به سایر مناطق کشور بیشتر می‌باشد، بنابراین اقدامات لازم جهت کنترل این بیماری ضروری به نظر می‌رسد(١٦ و١٥).

با توجه به مطالعات انجام شده در این منطقه و اهمیت این بیماری، در این مطالعه به بررسی ژنوتیپ انگل مولد بیماری پرداخته شد تا با توجه به نتایج حاصل و تعیین سویه انگل بتوان میزبان‌های اصلی و واسطه آن را شناسایی نمود و برنامه‌ریزی دقیقی جهت مدیریت و کنترل این بیماری در این منطقه طراحی نمود، لذا هدف این مطالعه تعیین خصوصیات مولکولی جدایه‌های کیست‌های هیداتید و انتشار آنها در کبد و ریه دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ بر روی ۹۳ کیست هیداتید جدا شده از دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج انجام شد.

جهت جمع‌آوری کیست‌های هیداتید با هماهنگی قبلی با مسئولین کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج به این مکان مراجعه و با حضور در خط کشتار با استفاده از ظروف تعیین شده، جهت اندام‌های خاص هر دام اقدام به جمع‌آوری بافت آلوده به کیست گردید. کیست‌های هیداتید در کشتارگاه به وسیله دامپزشک تشخیص داده شد و اندام‌های آلوده از خط تولید خارج گردیدند. در کوتاه‌ترین زمان اندام‌های آلوده به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی یاسوج منتقل شدند. ابتدا کیست‌ها از بافت آلوده جدا شده و سپس روی کیست‌ها با الکل ضدعفونی شده و با سرنگ مایع درون کیست‌ها خارج گردید. مایع خارج شده به لوله های آزمایش منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی خارج شده و عمل شستشو با سرم فیزیولوژی ۳ بار تکرار شد. در پایان مایع رویی دور ریخته شد و با تهیه یک لام مرطوب از رسوب و بررسی میکروسکوپی حضور پروتواسکولکس‌ها اثبات گردید. رسوب‌های حاصله در الکل ۷۰ درجه و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام روش‌های ملکولی در لوله‌های جداگانه با کدهای مخصوص نگهداری شدند.

برای استخراج DNA ابتدا رسوب حاوی پروتواسکولکس‌ها چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و سپس DNA نمونه‌ها با استفاده از روش هضم انگل در SDS، پروتئیناز K و استخراج با روش استاندارد فنل- کلروفرم و رسوب اتانل استخراج شده و غلظت DNA آنها با روش اسپکترومتری تعیین شد و سپس در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تست نگهداری شدند(۱۷).

در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز [1]تکثیر توالی از قطعه‌ی rDNA-ITS1[2] به کمک دستگاه ترموسایکلر (گرادیانت، اپندورف آلمان) با استفاده از پرایمرهای EgF با توالی (5'-GTC GTA ACA AGG TTT CCG TAG G-3') و EgR با توالی(5'-TAG ATG CGT TCG AAG TGT CG-3') انجام شد. این پرایمرها در مطالعات قبلی محققین طراحی و استفاده شده بودند(۱۸).

قطعه ITS1 شامل مقداری از ژن 18s و قسمت اعظم ژن5/8s مربوط به ژن‌های rDNA انگل است. برای تکثیر قطعه فوق حجم ۵۰ میکرولیتری شامل بافر 10x ۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای EgF و EgR هر کدام ۲۵ پیکومول، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز ۱ واحد، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار ۲ میکرولیتر و DNA الگو ۲ میکرولیتر استفاده شد. سپس با آب مقطر

1-Polymerase Chain Reaction(PCR)
2- ribosomal DNA- Internal Transcribed Spacer1(rDNA-ITS1)

حجم نهایی واکنشگرها به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیه‌ی مخلوط PCR، برنامه‌ی دمایی برای ۳۰ سیکل استفاده شد.

بعد از اتمام تکثیر قطعه ژن موردنظر در دستگاه ترموسایکلر، محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

برای هضم آنزیمی‌محصول با روشRFLP از دو آنزیمAlu1 و Rsa1 که به ترتیب توالی های AG/CT و GT/AC رشته‌هایی DNA را شناسایی و قطع می‌کنند، استفاده شد(۲۱-۱۹). به این صورت که یک میکرولیتر از آنزیم برش دهنده در ۲ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم با ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۱۰ میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شده، و باندهای ایجاد شده با نور ماورای بنفش مشاهده و با دستگاه ژل داکیومنتیشن عکس‌برداری و ثبت گردیدند.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۹۳ کیست هیداتید شامل؛ ۳۱ نمونه گوسفند، ۵۶ نمونه بز و ۶ نمونه گاو از کبد و ریه دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج تهیه شدند(جدول۱).

DNA پروتواسکولکس‌های این کیست‌ها با استفاده از روش PCR-RFLP، قطعه‌ی rDNA-ITS1 مورد بررسی قرار گرفتند. که قطعه‌ی ITS1، DNAی ریبوزومی‌اکینوکوکوس گرانولوزوس با روش PCR تکثیر گردید و با هضم آنزیم‌های Alu1 و Rsa1 الگوهای حاصله بررسی شدند. محصول واکنش PCR، باندهایی به اندازه ی حدوداً Kb[1] ۱ بود. این نتیجه نشان دهنده حضور پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس در نمونه‌های مورد بررسی بود(تصویر ۱). پس از انجام روش RFLP باندهای ایجاد شده بر اثر برش آنزیم‌های به کار برده شده بر روی محصول PCR بر اساس الگوی برشی این آنزیم‌ها ژنوتیپ G1 را برای تمامی نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه مطرح می‌نماید. الگوی RFLP محصول PCR تمام ایزوله‌ها با آنزیم‌های برش دهنده یکسان بود. به طوری که برای آنزیم برش دهنده‌ی Alu1 برای تمام ۹۳ ایزوله قطعات ۲۰۰bp و ۸۰۰bp (تصویر ۲) و برای آنزیم برش دهنده‌ی Rsa1 قطعات ۶۵۵bp و ۳۴۵ bp به دست آمد(تصویر۳).

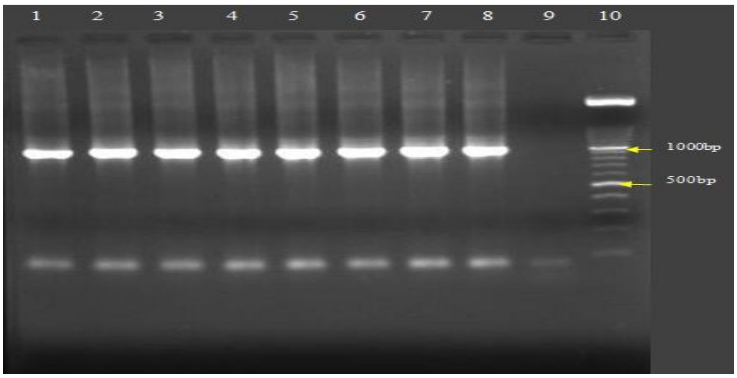
بحث

با توجه به وجود ۱۰ ژنوتیپ مختلف از انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس با میزبان‌های واسطه و نهایی مختلف و اثرگذاری این ژنوتیپ‌ها در چرخه زندگی انگل و انتقال آن به انسان(۳ و۴)، هدف این مطالعه تعیین خصوصیات مولکولی جدایه‌های کیست‌های هیداتید و انتشار آنها در کبد و ریه دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج بود.

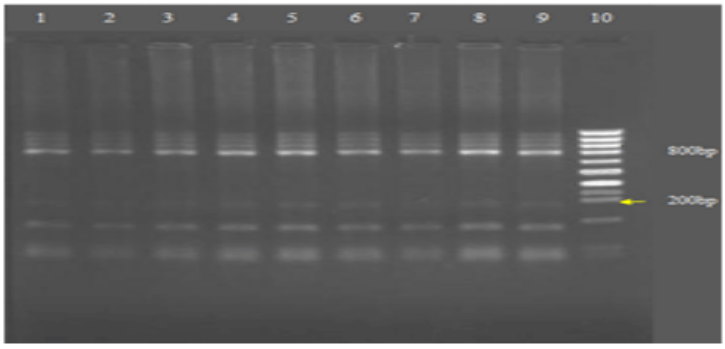
1-Kilo Base Pair(kb)

جدول ۱: مقایسه فراوانی توزیع کیست‌های هیداتید جمع آوری شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج

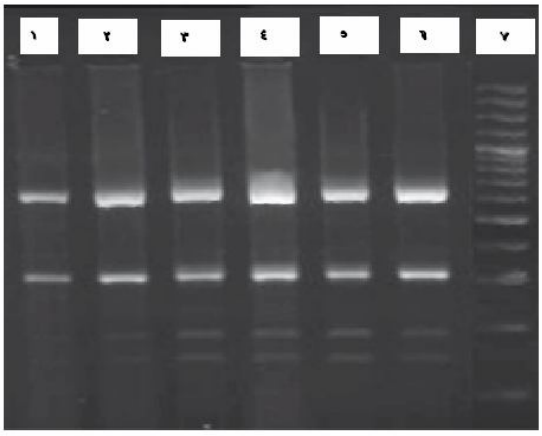
عضو آلوده	ریه	کبد	جمع
نوع دام	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
گوسفند	(۳۵/۵)۱۱	(۶۴/۵)۲۰	(۳۳/۳)۳۱
بز	(۳٤)۱۹	(٦٦)۳۷	(٦٢)٥٦
گاو	(۰)۰	(۱۰۰)٦	(۶/۴)۶
مجموع	(۳۲/۲)۳۰	(۶۷/۸)۶۳	(۱۰۰)۹۳



تصویر ۱: الکتروفورزمحصولات PCR مرحله دوم، شماره ۱تا ۷ ایزوله‌های مثبت جدا شده از دام‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج ، شماره ۸ کنترل مثبت، شماره ۹ کنترل منفی، شماره ۱۰ سایز مارکر.



تصویر ۲: الکتروفورز محصولات RFLP، شماره ۱تا۹ نمونه‌های مثبت با آنزیم AluI برای ایزوله های جدا شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج، شماره ۱۰ سایز مارکر.



تصویر۳: الکتروفورز محصولات RFLP، شماره ۱ تا ۶ نمونه های مثبت با آنزیم RsaI برای ایزوله های جدا شده از دام های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی شهر یاسوج، شماره ۷ سایز مارکر.

در این مطالعه پس از الکتروفورز محصول واکنش PCR، طول قطعه تکثیر شده در تمام نمونه‌ها یکسان و برابر ۱۰۰۰bp بود که نتایج PCR نمونه‌های تهیه شده مشابه با یافته‌های گزارش شده در سایر مطالعات بود(۲۲ و ۲۱، ۸). الگوی PCR-RFLP ژن ITS-1 در خصوص نمونه‌های تهیه شده از گوسفند، بز و گاو نشانگر حضور فعال ژنوتیپ سویه مشترک گوسفندی (G1) در دام‌های شهر یاسوج بود. احمدی و دلیمی(۲۰۰۶) در ایران در ایزوله‌های گوسفندی، شتری و انسانی با اندازه‌های قطعات DNA-ITS1 نتایج تقریباً مشابه گزارش کردند(۲۳). از طرفی جمالی و همکاران(۲۰۰۴) در ایزوله‌های انسانی، گاوی و گوسفندی از ایران اندازه قطعات DNA-ITS1 را با اندازه تقریبی ۱Kb گزارش کردند(۲۴) که مشابه اندازه قطعات DNA-ITS1 حاصل از ایزوله‌های گوسفند، بز و گاو در این مطالعه می‌باشد.

فصیحی هرندی و همکاران(۲۰۰۲) استرین‌های گوسفندی(G1) و شتری(G6) با الگوی مشابهی از RFLP بین ایزوله‌های گوسفندی و شتری با آنزیم‌های Alu1, Msp1, Rsa1 با روش PCR-RFLP ناحیه ITS1 از نواحی جغرافیایی متفاوت ایران گزارش کردند(۲۵). همچنین وجود استرین های متفاوت اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران با روش مولکولی PCR-RFLP در مطالعه‌ی احمدی و دلیمی(۲۰۰۶)، مک مونس و تامسون[1](۲۰۰۳) با روش‌های مرفولوژی و مولکولی در ایزوله‌های حیوانی و انسانی با چرخه‌های سگ، گوسفند و سگ و شتر به عنوان چرخه‌های فعال انگل مورد تأیید قرار گرفته است که می‌تواند در انتقال عفونت به انسان و سایر میزبان‌های واسطه تصادفی نقش داشته باشد(۲۳ و۵).

نتایج مطالعهٔ زانگ و همکاران[2](۱۹۹۸) بر روی ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس بیانگر آن بود که نقش ژنوتیپ گوسفندی(G1) در دام‌های اهلی نسبت به ژنوتیپ شتر(G6) شناسایی شده در گاو، گوسفند و بز قابل توجه تر است(۱). یوتوک و همکاران[3] (۲۰۰۸)در مطالعهٔ خود بر روی ایزوله‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در نواحی شرق و جنوب شرقی ترکیه که هم مرز با ایران است، با هضم آنزیمی‌محصول COX-1 و ITS-1 عنوان نمودند که سویه شایع در این مناطق نیز سویه گوسفندی(G1) است(۲۱). در مطالعه دیگری با روش PCR-RFLP کیست هیداتید کبد، ریه و طحال گاو، گوسفند و خوک در جزیره ساردینی ایتالیا، سویه شایع را متعلق به ژنوتیپ گوسفندی (G1) گزارش کردند(۲۲).

یخچالی و مرادی(۲۰۱۱) تعدادی دام آلوده به کیست هیداتید را مورد مطالعه قرار دادند. یافته‌های ملکولی براساس توالی نوکلئوتیدی ژن nad-1 نشان داد، تمامی نمونه‌های با منشأ نشخوارکنندگان و سگ (میزبان اصلی) الگوی RFLP مشابه داشتند که متعلق

1-McManus & Thompson
2-Zhang et al
3-Utuk et al

به سویه گوسفندی (G1) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد در این منطقه حداقل یک ژنوتیپ از انگل حضور دارد(۱۱). شربت خوری و همکاران(۲۰۱۰) در تحقیقی که با عنوان ژنوتیپ‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در دام‌های ایران و شناسایی فراوانی بالای ژنوتیپ G1 در شترها انجام دادند، مشخص نمودند که ایزوله‌های گوسفند، بز، گاو و به خصوص شتر۶۶/۷ درصد ژنوتیپ G1 و تعداد کمی‌از ایزوله‌های شتری ۳۳/۳ درصد به ژنوتیپ G6 تعلق داشتند(۱۸). یوسفی و همکاران(۲۰۰۷) در تحقیقی که با عنوان بررسی ملکولی کیست هیداتید با منشاء گوسفندی در استان چهارمحال و بختیاری انجام دادند، ثابت نمودند که سویه گوسفندی کیست هیداتید غالب در استان چهارمحال و بختیاری ژنوتیپ G1 بود، که مطابق با سویه شایع ایران و جهان است(۱۷).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد، سویه غالب انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در شهر یاسوج همانند سایر نقاط کشور استرین گوسفندی می‌باشد که در آن سگ میزبان اصلی و دام‌ها میزبان واسطه هستند، لذا کنترل بیماری در این دو میزبان می‌تواند انگل اکینوکوکوس را در منطقه کاهش دهد و در نتیجه انتقال آن به انسان نیز کاهش می‌یابد.

پیشنهاد می‌شود برای پی بردن به نقش ژنوتیپ گوسفندی در بروز آلودگی‌های هیداتیدی انسان مطالعات تکمیلی جامع تری با تعیین ژنوتیپ انگل در کیست‌های هیداتید جراحی شده از انسان انجام شود. در صورت تأیید نقش ژنوتیپ G1 در آلودگی انسانی این منطقه از کشور می‌توان در خصوص نکات مطرح در پیشگیری، کنترل و در مواردی تهیهٔ واکسن‌های نوترکیب متناسب برای سیستیک اکینوکوکوزیس انسان و دام اقدامات مؤثرتری انجام داده و گام‌های عملی مفیدی در جهت مبارزه و قطع کامل چرخه زندگی انگل در بین انسان، نشخوارکنندگان و گوشتخواران منطقه برداشت.

تقدیر و تشکر

از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و همکاران آن واحد و هم‌چنین از مسئولین و کارکنان کشتارگاه صنعتی یاسوج که در انجام این مطالعه همکاری داشتند، قدردانی می‌شود.

REFERENCES:

1.Zhang LH, Eslami A, Hosseini S, McManus D. indication of the presence of two distinet strains of Echinococcus in Iran by mitochondrial DNA markers. Am J Trop Med Hyg 1998; 59 : 171-17.
2.Jenkins DJ, Roming T, Thompson RCA. Emergence / re-emergence of Echinococcus SPP. Aglobal update. Int J Parasitol 2005; 35: 1205-19.
3.Ergin S, Saribas S, Yuksel P, Zengin K, Midilli K, Adas G, et al. Genotypic characterization of Echinococcus granulosus isolated from human in Turkey. Afri J of Micr Res 2010; 4 (7): 551-5.
4.Nakao M, Mc Manus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 2007; 134: 713-22.
5.McManus DP, Thompson RCA. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. J of Parasitol 2003; 127: 37–51.
6.McManus DP, Zhang L, Castrodale LJ, Lee TH, Pearson M and Blair D. Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of Echinococcus granulosus. Am J Ttrop Med Hyg 2002*;* 67:296-8.
7.Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein R. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. Parasitol Res 2004; 93: 127-30.
8.Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. Parasitol Int 2006; 55: 187-91.
9.Varcasia A, Canu S, Kogkos A, Pipia AP, Scala A, Garippa G, Seimenis A. Preliminary data on diffusion and molecular characterization of cystic echinococcosis in small ruminants in Peloponnesus, Greece. Parasitol Res 2007; 101: 1135-9.
10.Busi M, Snabel V, Vercasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S. Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of Echinococcus granulosus in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. Vet Parasitol 2007; 150: 75-83.
11.Yakhghaly M, Mardani K. Study on strain variation of Echinococcus granulosus in domestic life cycle by amplification of nda-1 gene by PCR-RFLP. Irn j Vet 2011; 7(1): 63-8.
12.Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E and Elmahdi IE. A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. Int J Parasitol 2004; 34: 645–53.
13.Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A. Several strains of Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina. J infect Gen Evol 2002; 2: 129-36.
14.Moshfe A, Molavi Gh, Mobedi I, Askarian Sh, Bagheri M, Mohammadi R, et al. Infection situation of Echinococcus granulosus in different host in Yasuj. Armaghane Danesh 2007; 12(1): 15-6.
15.Sarkari B, Naghmachi M, Azimi S, Vaezi M, Ebrahimi S. Human cystic Echinococcosis in Yasuj: (a survey of ten years hospital records. Armaghane Danesh 2007; 12(47):127-34.
16.Nikrooz L, Roozitalab M, Hossaini M, Naghizadeh MM, Azimi S. Comparison of initial and final diagnosis of hydatid cyst in patients hospitalized at Shahid Beheshti hospital during the years 2001-2006.
17.Yoosefi H, Hashemzadeh M, Aliyari Z. Molecular study of hydatid cyst (sheep strain) in Chaahrmohal va Bakhteyari by PCR-RFLP. J Shahrkord Uni 2007; 9(2): 28-33.
18.Sharbatkhori M, Mirhendi H, Fasihi Harandi M, Rezaeian M, Mohebali M, Eshraghian M, Rahimi H, Beigom Kia E. Echinococcus granulosus genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. Exp parasitol 2010; 124: 373-9.
19.Hop M, Bowles J, McManus DP. Areconsidertion of the Echinococcus granulosus strain in Australoa following RFLP analysis of cyctic material. Int J Parasitol 1997; 21(4): 471-5.
20.Bowles j, Mc Manus DP. NaDH dehedrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus. Int j parasitol 1993; 23: 969-72.
21.Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and south east regions of Turkey. Acta Tropica 2008; 107: 192-4.
22.Varcasia A, Canu S, Lightowlers MW, Scala A and Garippa G. Molecular characterization of Echinococcus granulosus strains in Sardinia. Parasitol Res 2006; 98: 273-7.
23.Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Gen Evol 2006; 6: 85-90.

24. Jamali R, Ghazanchaei A, Asgharzadeh M. Identification and characterization of Echinococcus granulosus by PCR-RFLP technique in Tabriz district. J Parasitic Dis 2004; 28(2): 69-72.
25.Fasihi Harandi M, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RCA. Molecular and morphological characterization of Echinococcus granulosus of human and animal origin in Iran. Parasitology 2002; 125: 367-373.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Characterization of Isolated Hydatid Cyst from Slaughtered Livestock in Yasuj Industrial Slaughterhouse by PCR-RFLP

Sadri A[1], Moshfe A [2*], Doosti A[3], Ansari H[1], Abidi H[4], Ghorbani Dalini S[1]

[1]Departement of Biology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Azad University, Jahrom, Iran,[2] Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Department of Biotechnology, Shahrkord Azad University, Shahrkord, Iran, [4] Department of Laboratoary Scinences, Faculty of Paramedicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran,

Received: 18 Nov 2012 Accepted: 13 Feb 2012

Abstract

Background & aim: Given the existence of 10 different genotypes of the parasite Echinococcus granulosus from different hosts and intermediate and final impact of these genotypes in the life cycle of the parasite and its transmission to humans, the purpose of this study was to determine the molecular characterization of isolates of hydatid cysts in industrial slaughterhouses of Yasuj city.

Methods: In this study, 93 animal isolates (56 goat, 31 sheep and 6 cattle) were collected from the industrial slaughterhouse of Yasuj city. The genomic DNA corresponding to protoscolices was extracted, using the standard Phenol–Chloroform method. The fragment of DNA-ITSI of each sample was assessed by PCR with designed primers of EgF, EgR and then amplified. Moreover, the PCR products were assessed by electrophoresis and digested by the Alu I and Rsa I enzymes. RFLP products were evaluated by electrophoresis.

Results: Using a PCR test, rDNA-ITSI of all isolates of similar size bands and 1000 bp were obtained respectively.The patterns generated by RFLP using Alu I and Rsa I enzymes, showed Echinococcus *granulosus* G1 genotype in all isolates.

Conclusion: This study showed that strain G1 is the predominant strain causing hydatid cysts in different organs of the animal in Yasuj.

Key words: *Echinococcus granulosus*, rDNA-ITSI, PCR-RFLP

***Corresponding Author: Moshfe A,** Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email: amoshfea@yahoo.com